

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平4-505401

⑬ 公表 平成4年(1992)9月24日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号

8214-4B  
8828-4B  
7236-4B

審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

C 12 N 15/00  
5/00

部門 (区分) 1 (1)

C  
B※

(全 11 頁)

⑯ 発明の名称 主要組織適合抗原に会合したペプチドを認識するモノクローナル抗体

⑰ 特 願 平3-505290

⑱ 出 願 平3(1991)2月14日

⑲ 翻訳文提出日 平3(1991)10月14日

⑳ 国際出願 PCT/FR91/00121

㉑ 国際公開番号 WO91/12332

㉒ 国際公開日 平3(1991)8月22日

優先権主張 ㉓ 1990年2月14日 ㉔ フランス (FR) ㉕ 90/01769

⑳ 発 明 者 ユイン・ティエン・デュック, フランス国、94800・ビルジュイフ、ブールパール・マキシム・ゴ  
ギイ ルキイ・19

㉑ 出 願 人 アンステイテユ・ナショナル・ フランス国、75654・パリ・セデクス・13、リュ・ドウ・トルビア  
ドウ・ラ・サンテ・エ・ドウ・ ック、101  
ラ・ルシエルシュ・メディカル

㉒ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外4名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 病原物質の抗原の特徴を有するペプチド又は細胞障害の特徴を有するペプチドと、このペプチドを認識及び固定する能力を有する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子とにより形成される複合体を特異的に認識する能力を有することを特徴とする (該ペプチドに非特異的なハプロタイプの MHC 分子と会合した該ペプチドを認識しないという意味での) 制限モノクローナル抗体。
2. 単独ペプチドに対して全く又は実質的に反応せず、及び/又は単独 MHC 分子を僅かに認識するか又は全く認識しないことを特徴とする請求項 1 に記載の制限モノクローナル抗体。
3. 認識されるペプチドがウイルス、細菌、寄生虫 (例えばマラリア原虫)、真菌類、特に病原性酵母のような病原物質、又は副組織適合抗原、腫瘍の特異的抗原もしくは自己免疫障害の特異的抗原を表すペプチドの特徴を示すことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の制限モノクローナル抗体。
4. 認識されるペプチドが 7~25、好ましくは 10 個のアミノ酸を有することを特徴とする請求項 1 から 3 のい

れか一項に記載の制限モノクローナル抗体。

5. 認識されるペプチドがヒト HIV レトロウイルスの特性を示し、特に gag タンパク質のペプチド、核タンパク質のペプチド又はペプチド K16F であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の制限モノクローナル抗体。

6. 認識される MHC 分子がクラス II と同様にクラス I の種々のハプロタイプであることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の制限モノクローナル抗体。

7. 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の制限モノクローナル抗体の製造方法であって、

— 所定のペプチドで被覆された同一遺伝子の脾細胞で予め免疫感作した動物の脾細胞を、脾細胞がミエロマ細胞に対して過剰、例えば約 10:1 の割合となるように、融合プロモーター (例えばポリエチレングリコール) の存在下でミエロマ細胞と融合させ、

— 例えば酵素 (例えばウレアーゼ又はアルカリホスファターゼ又はベルオキシダーゼ) に結合した抗マウス Ig 複合抗体をベースとする試薬を用いて ELISA 法を実施することにより、制限モノクローナル抗体を産生することが

可能なハイブリドーマを選択するためにスクリーニングを行い、

— こうして選択されたハイブリドーマを回収及びクローニングすることを特徴とする方法。

8. 形成される抗体に対応する抗原が製造を所望される制限モノクローナル抗体に対応するペプチドを特異的に認識するMHC分子に会合した該ペプチドを含む複合体により構成されるという条件下で、ミエローマ細胞と、該ペプチドで予め免疫感作した動物の脾細胞との融合により得られるようなハイブリドーマ。

9. 生物サンプル又は生存生物体でMHC分子に会合したペプチドの存在を診断するための組成物であって、請求項1から6のいずれか一項に記載の制限モノクローナル抗体を含有することを特徴とする組成物。

10. 病原物質、特にウイルスによる感染を検出できることを特徴とする請求項9に記載の診断用組成物。

11. 腫瘍を検出できることを特徴とする請求項9に記載の診断用組成物。

12. 自己免疫障害を検出できることを特徴とする請求項9に記載の診断用組成物。

ローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とするワクチン組成物。

13. 細胞毒性にすることが可能な物質、例えば毒素、抗生物質又は放射性同位体に結合されていることを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

14. 請求項13に記載の制限モノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

15. 病原生物による感染を生物サンプルで in vitro 診断するため、又は癌、自己免疫疾患もしくは他の細胞障害を診断するためのキットであって、

— 実施すべき診断に鑑みて必要とされる特異性を有する請求項1から6のいずれか一項に記載の制限モノクローナル抗体と、

— 抗体に結合した(抗原-MHC分子)複合体型の結合体の存在を検出するための手段

とを備えることを特徴とするキット。

16. 特に自己免疫病におけるT細胞の作用の変調のために、請求項1から6のいずれか一項に記載の制限モノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

17. 請求項1から6のいずれか一項に記載の制限モノク

## 明 細 書

### 主要組織適合抗原に会合したペプチドを認識するモノクローナル抗体

本発明は主要組織適合抗原に会合したペプチドを認識する制限モノクローナル抗体に係る。本発明は更に、所定の病気の診断と治療、場合により予防へのこれらの抗体の適用に係る。

主要組織適合遺伝子複合体分子(MHC分子)が免疫系に非自己から自己を識別させる認識機構として有用であることは知られている。MHC分子の主要機能はTリンパ球に抗原を与えることである。

MHC分子がクラスIに属するかクラスIIに属するかに従って、MHC分子と抗原とにより形成される複合体は夫々細胞毒性T細胞又はBリンパ球により抗体の合成を活性化させることが可能な補助T細胞により認識される。

種々の研究により、MHC分子に会合した抗原を認識する抗体の存在が既に立証されている。例えば、Van Leeuwen他(J. Exp. Med. (1979) 150, 1075-1083)は、HLA-A2型のMHC分子に会合したH-Y抗原を有するリンパ球を特異的に溶解させることが可能な抗体を含むポリクローナル血清が

貧血罹患患者に存在することを記載した。

しかしながら、現在までに知られている研究結果によると、制限モノクローナル抗体、即ち所定の抗原と、この抗原の同様に所定の特異的MHC分子とにより形成される複合体に特異的なモノクローナル抗体を製造することも同定することもできなかった。

このことに関しては、制限モノクローナル抗体の製造を目的として実験モデルを作成しようとした複数のチームが否定的な結果を報告している。

例えばA型インフルエンザウイルス、H3N2(X-31)株を抗原として使用したTamminen他のチーム(Tamminen他, Eur. J. Immunol. (1987) 17, 999-1006)及び抗原としてインシュリンを使用したRubin, Malissen, Jorgensen及びZeuthenのチーム(Rubin他, Res. Immunol. (1989) 140, ...)は否定的な結果を報告しており、即ち制限抗体を製造することができなかったと報告している。Klinmanのチームは肯定的な結果を記載している(Wyllie他, J. Exp. Med. (1982) 15

5, 403-414; Frescher及びKlinman, J. Exp. Med. (1986) 164, 196-210)。しかしながら、Klinman他の研究は、製造されるモノクローナル抗体が腫瘍ウイルスSV40により形質転換された細胞を認識すると示しているものの、認識される抗原も該当MHC分子も同定されていない。

本発明の制限モノクローナル抗体の製造に伴う困難は、種々の要因、特に具体的な抗体製造方法を完成し、スクリーニング感度の高い方法を得るという点に帰着し得る。

本発明者らは種々の病気の診断及び治療に制限モノクローナル抗体が果たし得る役割に着目した。

本発明者らは従来の困難を解消し、抗原とこの抗原を特異的に認識するMHC分子との会合により構成される複合体に特徴的な制限モノクローナル抗体を得た。

従って、本発明はMHCの分子に会合した抗原を認識する制限モノクローナル抗体に係る。制限モノクローナル抗体産生性のハイブリドーマ株も本発明の範囲に含まれる。

本発明は更に、感染又は腫瘍症状もしくは自己免疫疾患を発生し得る細胞障害の存在の診断用組成物にも係る。

本発明は更に、感染又は上記のような細胞障害の治療用組成物にも係る。

本発明は更に、本発明の制限モノクローナル抗体の製造方法にも係る。

本発明の制限抗体により認識される複合体の2成分の一方を構成する上記抗原は、感染もしくは病原物質に由来するタンパク質の分解から得られるようなペプチド、又は細胞障害から得られるペプチド、又は自己分解したタンパク質である。これらのペプチドは例えばリソソーム又はゴルジ装置の酵素による酵素切断により得られる。

複合体を形成するためには更に、ペプチドとMHC分子とが相互に結合できることが必要である。

制限モノクローナル抗体を製造するためには、これらのペプチドは有利には従来のペプチド合成方法に従って化学的合成経路により得られる。

ペプチドは同様に、病原物質のタンパク質又は腫瘍型もしくは自己免疫型の細胞障害に関与するタンパク質、特に突然変異タンパク質のような天然タンパク質から製造され得る。

本発明のモノクローナル抗体は、病原物質の抗原の特徴

を有するペプチド又は細胞障害の特徴を有するペプチドと、このペプチドを認識及び固定する能力を有する主要組織適合抗原複合体(MHC)の分子とにより形成される複合体を特異的に認識することができることを特徴とし、該抗体はペプチドを固定しない(ペプチドに非特異的)ハプロタイプMHC分子と会合する該ペプチドを認識しないことから、制限モノクローナル抗体である。

ペプチドークラスIのMHC分子の結合の特異性を決定するためには、BOUILLOT他(Nature, 1989, vol. 339, p. 473-475)により記載されているような試験を実施することができる。この試験によると、MHC分子に対する特異性を求めるペプチドを、クロム51のような放射性同位体で標識した細胞上で既知のMHC分子と共にインキュベートする。このインキュベーション後、懸濁液をペプチドの特異的細胞毒性リンパ球(CTL)の存在下におく。CTL細胞がペプチド及びMHC細胞の存在下においた細胞を溶解するとき、MHC細胞はペプチドに対する特異的親和性を有すると推測することができる。

同様に、ペプチドとクラスIIのMHC抗原との機能的且

つ特異的会合を測定することが可能な種々の試験が存在する。例えば Settle 他 (P. N. A. S. (1989), Vol. 86, p 3296-3300) の試験を実施することができる。

上記抗体は制限モノクローナル抗体なる用語により表される。

本発明の一実施態様によると、制限モノクローナル抗体は更に、該抗体が特異的でありながら分離状態で存在するペプチドに対して全く又は実質的に反応しないこと、及び／又は単独 MHC 分子を僅かに認識するか又は全く認識しないことを特徴とする。

単独ペプチドを認識する能力を実質的にもたない抗体は、本発明によると、バックグラウンドノイズに対応する信号の2分の1未満の反応をこのペプチドとの間に示す抗体である。

単独 MHC 分子を僅かに認識する抗体は、ペプチド-特異的 MHC 複合体との間に同一条件で存在する反応の約 1/10 ~ 1/5 の反応に従ってこの MHC 分子を認識する。

得られるモノクローナル抗体が本発明の定義に合致するか否かを決定するためには、例示として以下に説明するよ

制限モノクローナル抗体に対応するペプチド又は該ペプチドなしに対応する単独 MHC 分子を含む細胞)と、結合しない即ち非特異的なパートナーと会合したこれらの成分の一方又は他方(形成が所望される制限モノクローナル抗体に対応し、調査下の MHC 分子に会合したペプチド以外のペプチド又は製造が所望される制限モノクローナル抗体に対応し、非特異的 MHC 分子に会合したペプチド)とから構成される。

上記陽性反応は、制限抗体以外の全反応成分を含むウェルに観察される光学密度(OD)の少なくとも2倍の光学密度により表される。

本発明の制限モノクローナル抗体は高い選択性を有するという利点があり、従って、診断、治療及び場合によりワクチン接種に適用すると特に有利である。

本発明の抗体により認識されるペプチドは、ウイルス、細菌、寄生虫(例えばマラリア原虫)又は真菌類、特に病原性酵母のような病原物質の特徴を示し得る。

副組織適合抗原を表すペプチド、腫瘍もしくは癌型又は自己免疫型の細胞障害の特徴を有するペプチドも認識される。

うな ELISA 型の酵素抗体反応を実施することができる。

酵素抗体反応はまず、ハイブリドーマ培養上清上でウレアーゼ又はアルカリホスファターゼに結合した抗マウス Ig<sub>g</sub> 複合抗体をベースとする試薬により実施される。次に例えばアルカリホスファターゼに結合した抗マウス Ig 複合抗体により反応を確認する。量的として使用される細胞は、例えば形成が所望される抗体に対応するペプチドと共に(細胞 10<sup>7</sup>個あたり 5~50  $\mu$ g/ml の割合で 37℃ で 1~2 時間)予めインキュベートした脾細胞である。Ternynck 及び Avrameas (Ternynck 及び Avrameas: Techniques immunoenzymatiques - Les éditions INSERM, 1987)により記載の方法に従ってポリ-L-リシンを介してポリビニルプレートに細胞を固定する。

制限モノクローナル抗体が本発明に属するか否かを立証するために使用され、従って本発明の制限モノクローナル抗体との間に陽性の反応を与えてはならない対照は、別々に採用される成分の一方又は他方(即ち形成が所望される

本発明の好適実施態様によると制限モノクローナル抗体は、認識されるペプチドが 7~25、好ましくは 10 個のアミノ酸を有することを特徴とする。

MHC 分子により所定の抗原を与えるためには、上記に近いアミノ酸長を有するペプチドが存在すれば、MHC 分子との固定反応及び本発明の抗体による認識反応に十分であり得る。

本発明の制限モノクローナル抗体を製造及び決定するためには、所与の種について同様に特異的な MHC 分子の可溶化及び／又は可溶性形態に会合したペプチドにより構成される抗原を使用することもできる。可溶化形態を使用する場合、triton X100 もしくは NP40 のようなイオン性洗剤又はオクチル- $\beta$ D-グリコピラノシドのような非イオン性洗剤で可溶化することにより製造され、可溶化後、アフィニティークロマトグラフィーにかける。可溶化形態の分子を製造するためには、STALLCUPK 他 (J. of Immunology, 1981, vol. 127, page 923)に記載の方法を参照されたい。

MHC の可溶性分子を使用する場合、このような分子は

遺伝子工学によりトランスメンブラン部分を欠失させることにより得られる。

この可溶性分子は、発現が所望されるMHC分子をコードする遺伝子の挿入により修飾された細胞宿主により作成され得、この遺伝子は分子のトランスメンブラン部分をコードする配列を欠失する。この配列の抑圧を考慮してMHC分子のH鎖とL鎖をGGGS型のポリリンカーに結合する。遺伝子は調節成分が細胞宿主により認識されるような条件下で宿主に取り込まれる。適切な細胞宿主は例えば昆虫細胞である。

特定の制限モノクローナル抗体は、認識されるペプチドがヒトHIVレトロウイルスの特性を示し、特にgagタンパク質のペプチド、例えばペプチドgag5 (GHQAAMEMLKE) もしくはNeosystem (Strasbourg, リファレンスSP89-158) により合成されたペプチドgag p25 (配列263-277)、又は内部タンパク質p14 (核タンパク質) のペプチド、特にClaverie JM他によりEur Jour Imm 1988 vol 18 p 1547-1553に記載されているペプチドK16Fであることを特徴と

HLA-CW3)であることを特徴とし得る。

本発明の特定の制限モノクローナル抗体は、ハプロタイプHLA-B27又はHLA-A11の分子に会合したHIVのタンパク質p25 (gag) のペプチド、特にペプチドgag5を認識する抗体である。

本発明は更に、本発明の制限モノクローナル抗体の製造方法にも係る。これらの制限モノクローナル抗体の製造に適した第1の方法は、

— 所定のペプチドで被覆された同一遺伝子の脾細胞で予め免疫感作した動物の脾細胞を、脾細胞がミエローマ細胞に対して過剰、例えば約10:1の割合となるように、融合プロモーター (例えばポリエチレングリコール) の存在下でミエローマ細胞と融合させ、

— 例えば酵素 (例えばウレアーゼ又はアルカリホスファターゼ又はベルオキシゲナーゼ) に結合した抗マウスIg複合抗体をベースとする試薬を用いてELISA法を実施することにより、制限モノクローナル抗体を産生することが可能なハイブリドーマを選択するためにスクリーニングを行い、

— こうして選択されたハイブリドーマを回収及びクロー

する。

本発明の他の制限モノクローナル抗体は、Wraith他 (Cell 1988 vol. 59 p247-255) により記載されているミエリンMPB1-11の塩基性タンパク質の自己抗原のペプチド、Mozes他 (EMBO Journal 1989 vol 8 p 4049-4052) により記載されているアセチルコリンのレセプターのαサブユニットのペプチド、Gradehandt他 (Immunological Reviews, (1988) vol. 106, p59-75) により記載されているインシュリンのα鎖のペプチド、Chisari他 (Cell 1989 vol 59 p 1145-1156) により記載されているB型肝炎ウイルスのエンベロープのペプチドのようなペプチドに対して特異的である。

本発明の抗体は更に、認識されるヒトMHC分子がクラスII (例えばHLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5) と同様にクラスIの種々のハプロタイプ (例えばHLA-A2, HLA-A3, HLA-B7, HLA-B12, HLA-B27, HLA-B37,

ニングすることを特徴とする。

細胞毒性法のような別の方法をスクリーニングに使用してもよい。

上記制限モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマも本発明の範囲に含まれる。これらのハイブリドーマは、形成する抗体に対応する抗原がMHC分子に会合した上記ペプチドを含む複合体により構成されるような条件下で、ミエローマ細胞と、ペプチド-抗原で予め免疫感作した動物の脾細胞との融合産物である。

好ましくは、ハイブリドーマは上記脾細胞をHGPRT<sup>-</sup>型のみエローマ、例えばX63-Ag8, NS-1又はSP2/0と融合することにより得られる。

ハイブリドーマの製造はKohler及びMilstein (Nature, 1974, 256:495-497) のプロトコルに従って行った。

MHC分子を与えるリンパ球又は非リンパ球、正常又は腫瘍性細胞は、好ましくはマウスのハプロタイプH-2<sup>d</sup>、H-2<sup>b</sup>、H-2<sup>k</sup>、H-2<sup>d</sup>又はH-2<sup>b</sup>であるが、(同一のヒトMHCを発現する) トランスジェニック又は非トランスジェニックマウスでヒト (又は他の種の) MHC分子

を発現する細胞でもよい。

本発明は更に、製造が所望される制限モノクローナル抗体に対応する好ましくは免疫性のペプチド又はポリペプチドで被覆されたヒト又は動物(例えばマウス)のリンパ球又は非リンパ球細胞にも係る。

本発明の制限モノクローナル抗体の第2の製造方法は、エアスタイン-バーレルウイルスで不死化した血液のB細胞と、形成が所望される制限モノクローナル抗体に対応するペプチドに予め接触させたヒトBリンパ球とを融合させることからなる。

形成が所望されるモノクローナル抗体に対応するペプチドと予め接触させたB細胞は、ペプチドで予め免疫した供与体に対して非毒性であるとき、この供与体の末梢血から採取され得る。これらのリンパ球Bは、ペプチドと *in vitro* で接触培養することによっても得られ、ペプチドで被覆されたB細胞を回収する前に1又は複数の刺激サイクルを実施する。

最後に、制限抗体、又はこれらの抗体のFab部分のような類似分子、又はMHC-ペプチド複合体を認識する能力を有するT細胞のレセプターの類似体は、Huse他

体又は類似体、ヒト又は(例えば上記に類似の方法によりマウスもしくはハムスターで得られるか、又はBorrebäck他、P. N. A. S. (1988), vol. 85, p. 3995-3999の方法に従って得られる)他の種の制限モノクローナル抗体に係る。

本発明の抗体は、種々の用途に非常に有利である。本発明の抗体は例えば感染の診断、又は所定の癌もしくは自己免疫疾患で出現するような細胞障害の診断に使用される。

本発明はこのために、試験される生物サンプル中でMHC分子に会合したペプチドの存在を診断するための組成物に係り、該組成物は上記のような制限モノクローナル抗体を含有することを特徴とする。

この診断用組成物は生物サンプル、又は生存生物で<sup>4</sup>使用され得る。

この最後の適用によると、医療作像で実施される診断方法を利用する。

このように仮定すると、制限モノクローナル抗体は放射性物質又は蛍光染色もしくはLASER法により可視化され得る物質により標識される。

上記のような抗原が関与する所定の病気を診断するため

(Science, (1989), 246, 1275)、Ward他(Nature, (1989), 341, 544)、Bird他(Science, (1988), 242, 423)等の方法に従って大腸菌又は他の微生物で得られる。

これらの方法に従うと、PCR技術により増幅され且つ制限モノクローナル抗体をコードする遺伝子、又はマウスもしくはヒトもしくは他の種の特異的T細胞のレセプターをコードする遺伝子を、それらの発現を可能にする条件下で適切なベクターを介して大腸菌に導入する。次に、ペプチド-MHC分子複合体の認識に必要な特異性を示す発現分子を決定するためにスクリーニングを行う。スクリーニングは上記方法に従って実施され得る。

上記方法は同様に、制限抗体もしくは特異的T細胞レセプターをコードする遺伝子配列、又はこれらの配列の突然変異体を導入することによっても実施され得る。

制限モノクローナル抗体をコードする遺伝子又は遺伝子フラグメントは、上述のように製造される免疫細胞からDNAを抽出することにより得られる。

従って、本発明は大腸菌又は他の微生物で産生される抗

には、検出される患者の体内に存在するMHC分子のハプロタイプを考慮することが必要である。

本発明は更に、病原生物による感染を生物サンプルで *in vitro* 診断するため、又は癌、自己免疫疾患もしくは他の細胞障害を診断するためのキットに係り、該キットは、実施すべき診断に鑑みて必要とされる特異性を有する本発明の制限モノクローナル抗体と、抗体に結合した(抗原-分子又はペプチド-MHC分子)複合体型の複合体の存在を検出するための手段とを備えることを特徴とする。

使用される生物サンプルは有利には血清又は他の任意の生物流体である。

生物サンプルを本発明の抗体と接触させる段階と、抗体-(抗原-分子又はペプチド-MHC分子)複合体型の複合体の存在を検出する段階とを含む、感染又は細胞障害の *in vitro* 検出用試験も本発明の範囲に含まれる。

本発明の抗体の診断への適用は、AIDSのHIVウイルスのようなウイルスを検出するため、又は腫瘍もしくは自己免疫障害を検出するために使用され得る。

本発明の一実施形態によると、制限モノクローナル抗体

## 特表平4-505401(7)

本発明の他の特徴及び利点は以下の実施例に明示される。

### 実施例

#### 制限型の抗体を分泌するハイブリドーマの作製

##### 免疫感作

ペプチドで被覆した同一遺伝子脾細胞の腹腔内注射によりBALB/c(H-2<sup>d</sup>)系マウスを免疫感作した。この場合、インフルエンザウイルスの核タンパク質のペプチドNP147-158R<sup>-</sup>を使用した。培養培地(DMEM+2%ウシ胎児血清)1mlの容量中にペプチド100μgあたり細胞10<sup>7</sup>個の割合で脾細胞をペプチドと共に予めインキュベートした。インキュベーションはCO<sub>2</sub>(5%)炉内で1時間実施した。1週間に1回の割合でマウスに3回腹腔内注射した。3回目の注射から3週間後に4回目の注射を行い、その後、マウスを殺して脾臓を抽出した。脾臓の抽出は4回目の注射から3日後に行った。4回目の注射は2経路で行ない、懸濁液0.5mlを腹腔内経路で注射すると共に、0.5mlを静脈内に注射した。

##### 細胞融合

DMEM+5%ウシ胎児血清培地で解離後に脾臓から脾細胞を得た。赤血球を0.83%塩化アンモニウム(NH

を細胞毒性にすることもできる。

この場合、本発明の抗体は特に細胞毒性でない場合、例えば競合により上記感染又は障害の治療用医薬組成物に有効成分として含有され得る。この場合、抗体は許容可能な医薬ビヒクルと混合される。

抗体を細胞毒性にすることが可能な物質は毒素、抗生物質、放射性同位体である。

このような抗体は免疫治療で使用され得る。

本発明は更に、本発明の制限モノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物にも係る。医薬組成物に配合されるこのような抗体は、特に自己免疫疾患で特異的T細胞の作用を阻止するために競合剤として特に使用され得る。

更に、特に自己免疫疾患の場合に抗イディオタイプ抗体の産生を刺激するためのワクチンとしての制限モノクローナル抗体の適用も本発明の範囲に含まれる。

従って、本発明のワクチン組成物は有効成分として上記制限AcMを含有する。制限AcMの注入により産生される抗イディオタイプ抗体は、自己反応性T細胞を認識及び除去する。

(Cl)により溶解させ、次にリンパ球をDMEM+5%ウシ胎児血清で3回洗った。

融合パートナーは3種類のHGPRT<sup>-</sup>ミエローマ、即ちX63-Ag8、NS-1及びSP2/0により構成した。換言するなら、リンパ球をミエローマX63、NS-1又はSP2/0に別々に融合した。融合はMERCCK社のポリエチレングリコール(PEG1500)を用いてミエローマ細胞1個につきリンパ球10個の割合で行った。プロトコルは以下に記載するKöhler及びMilstein(Nature, 1974, 256:495-497)のプロトコルに基づき、リンパ球とミエローマ細胞(X63、NS-1及びSP2/0)を上記割合で融合した。3種の調合物(リンパ球とX63又はNS-1又はSP2/0との調合物)を250g及び4℃で10分間遠心分離した。細胞残渣の上に液体膜を残しながら上清を除去した。試験管を水浴中で37℃にした。細胞残渣にポリエチレングリコール1500溶液(pH7のRPMI中50%PEG1500溶液)1mlを滴下した。1分間の操作後、DMEM+10%ウシ胎児血清20mlを加えた。全体を37℃水浴に更に3分間放置し、次に試験管を25

0g及び4℃で15分間遠心分離した。上清を除去し、細胞をDMEM+10%ウシ胎児血清20mlで1回洗った。次に、DMEM+10%ウシ胎児血清にHAT培地(母溶液HAT 100X: ヒポキサンチン1.36mg/ml、アミノプテリン0.018mg/ml及びチミジン0.76mg/ml)を加えた溶液に細胞をとった。細胞懸濁液をプラスチック製培養プレート(NUNCION、96ウェル)のウェルにウェル当たり細胞10000個を含むように200μlの割合で分配した。次に50000個の正常脾細胞、又は好ましくは300radの放射線照射した正常脾細胞を各ウェルに「充填細胞」として加えた。こうして細胞をCO<sub>2</sub>(5%)炉で37℃で7~10日間インキュベートした。

##### スクリーニング

7~10日後、各ウェルの上清を除去し、ELISA酵素抗体反応によりスクリーニングした。スクリーニングはまずウレアーゼに結合した抗マウスIg複合抗体をベースとする試薬を用いて行い、次にアルカリホスファターゼに結合した抗マウスIg複合抗体により確認した。個別的として使用した細胞はペプチドNP 147-158R<sup>-</sup>(細

胞 $10^5$ 個につき $5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )と共に $37^\circ\text{C}$ で1～2時間予めインキュベートした脾細胞である。Ternynck及びAvrameas (Ternynck及びAvrameas: Techniques immunoenzymatiques - Les éditions INSERM, 1987)に記載の方法に従ってポリ-L-リシンを使用してポリビニルプレート (Dynatech) に脾細胞を固定した。

陰性対照 (標的細胞と培養上清なしの複合抗体との反応) の少なくとも2倍の光学密度 (OD) 値を与えたウェルを選択した。観察される反応が「自己抗体」によるものでないようにするために、同一ウェルの上清をペプチド及び同一ハプロタイプで被覆しない細胞でも同様に試験した。更に、単独 (細胞なし) でプレートに直接固定した該当ペプチドについても試験し、選択された上清がペプチドで覆われた細胞のみと反応することを確認した。

選択を行い、ウェルを3～4回クローニング及びサブクローニングした。各クローニング及びサブクローニング毎に上清を上記同一基準で繰り返し試験した。同時に、ハイブリドーマのイソタイプを決定するために酵素抗体反応を

第1群ではP815細胞単独をマウスDBA/2に注射し、この群は同系宿主におけるP815細胞の増殖対照として使用した。

第2群のマウスには $5 \mu\text{g}/10^5$ 細胞の割合でP815細胞と制限抗体との混合物 (抗体X5.3のサブクローンX.5.3.7.T) を投与した。これらのマウスは細胞と単独抗体とを投与した対照として使用した。

第3群のマウスには、 $10 \mu\text{g}/10^5$ 細胞の割合でインフルエンザウイルスの核タンパク質のペプチドNP<sub>33</sub>と共に $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした細胞P815を投与した。この群は細胞と単独ペプチドとを投与した対照として使用した。

第4群のマウスには、ペプチドと共にインキュベートしてから制限抗体X.5.3.7.Tの存在下においた細胞P815を対照群2及び3と同一条件及び割合で投与した。

同一数の細胞P815 ( $10^5$ 個/匹) を各マウスに注射し、皮下腫瘍の増殖を個々に追跡調査した。結果を各群の腫瘍の平均直径、可視腫瘍を有するマウスの百分率及び致死性腫瘍の百分率で表した。

#### 結果

適用した。この段階では同時に制限を決定するための反応、換言するなら、所望のハプロタイプ、この場合H-2<sup>d</sup>との間でのみ観察されるべき反応を実施した。

#### 結論

ペプチド (NP<sub>33</sub> 147-158 R<sup>-</sup>) で被覆した特定のハプロタイプ (H-2<sup>d</sup>) の脾細胞のみと反応するという意味で所謂制限型の抗体の特徴を有する3種のハイブリドーマが得られた。これらの3種のクローンを夫々イソタイプIgG<sub>2b</sub>, K, IgG<sub>1</sub>, K及びIgG<sub>2b</sub>, KのN6.6, S.2.2及びX5.3と命名した。

#### ペプチドの特異的制限抗体が腫瘍増殖に及ぼすin vivo効果

この実験の目的は、抗ペプチド制限抗体が、特異的ペプチドと接触した腫瘍細胞のin vivo増殖を阻害する能力を試験することである。

#### 実験プロトコル

DBA/2 (H-2<sup>d</sup>) マウスを各4匹からなる4群に分けた。肥満細胞腫P815 (同系宿主 (マウスDBA/2) に一旦注射すると致死性腫瘍を増殖する移植可能な腫瘍細胞) の細胞懸濁液を皮下注射によりマウスに投与した。

#### 1) 細胞P815を注射した同系宿主における腫瘍の変化

種々の調合物を注射したマウスDBA/2における腫瘍の増殖を、時間の関数として各群の腫瘍の平均直径の曲線により表した (図1)。

特に細胞注射後24日目に、3つの対照群 (P815細胞単独、細胞P815+単独抗体、細胞P815+単独ペプチド) の各々の4匹のマウスに、夫々7.5、10.25及び7.75 mmの平均直径を有する4個の腫瘍の存在が検出され、実験群 (細胞P815+ペプチド+抗体) の4匹のマウスに平均直径4.5 mmの2つの腫瘍の存在が検出された。

#### 2) 致死性腫瘍の増殖

実験に用いた各群の致死性腫瘍の数は群1 (細胞P815単独) 3/4、群2 (細胞P815+抗体単独) 4/4、群3 (細胞P815+ペプチド単独) 4/4、群4 (細胞P815+ペプチド+抗体) 2/4であった。

対照全体 (群1+2+3) では12個中11個即ち92%が致死性腫瘍であり、これに対して実験群では4個中の2個即ち50%であった。

H-2K<sup>d</sup>に結合した腫瘍アルブミンOVA<sub>323-333</sub>又はI,



20 Kの抗ペプチド制限抗体を分泌するハイブリドーマ

このペプチドOVA<sub>323-373</sub>より簡単には組成 I I N F E K L T E W T S S N V M E E R K を有するアミノ酸数 20 の I 20 K は、特異的細胞毒性 T リンパ球によりクラス I の M H C 分子 (H-2 K\*) と会合した状態で認識される (Carbone 及び Bevan, J. Exp. Med., 1989, 169: 603; J. Exp. Med., 1990, 171: 377)。

インフルエンザウイルス N P R- のペプチドについて記載したと同一の方法を使用することにより、E L I S A 試験及び補体依存細胞毒性試験で H-2 K\* を発現するリンパ球の存在下にペプチド I 20 K を認識するハイブリドーマ (9.3.2) を得た。ペプチドの不在下に H-2 K\* を発現する細胞から構成した対照又は別のハプロタイプ (H-2 K\*) を有する細胞と共にペプチド (I 20 K) をインキュベートした調合物から構成した対照は認識されなかった。

これらの抗 O V A<sub>323-373</sub> ペプチド制限モノクローナル抗体に関する調査は、抗 N P R- ペプチド制限抗体の調査に適用したと同一の実験図式を再現した。更に、分子 K\*

5.7/T は特異的標的 (細胞 P 815-H-2\*+ペプチド) の 30% を溶解させ、細胞 P 815 を予めペプチドと接触させない場合は 0% であった。

2) 放射性ヨウ素 125 による表面標識後の免疫沈降

ラクトベルオキシゲナーゼ酵素を使用する方法 (Marchalonis, J. J., Biochem. J., 1969, 113: 291) により、標的細胞 (細胞+ペプチド) 又は対照 (ペプチドなしの細胞) を放射性ヨウ素 125 で標識した。標識後、細胞を酵素阻害剤の存在下に洗剤 Triton X-100 により溶解させた。溶解物をセファロースビーズ-アプロテイン A の存在下に非結合抗体 (対照抗体) と共にインキュベートした。遠心分離後、溶解物を特異的抗体 (制限抗体) と共にインキュベートした。複合体をセファロースビーズ-アプロテイン A に吸着させ、洗浄し、回収し、ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動 (SDS-PAGE) により分析した。

この結果、対応するハプロタイプを有する細胞をペプチドと共にインキュベートすると、制限抗体はオートラジオグラフィーにより沈降バンドを与えることが判明した。(ペプチドの不在下ではこの実験の結果は極めて弱い、全く

の場合、C 57 B1/6 系のマウスに由来する突然変異分子 K\* (K\*) と会合したペプチドの認識を調査することができれば特に有利である。

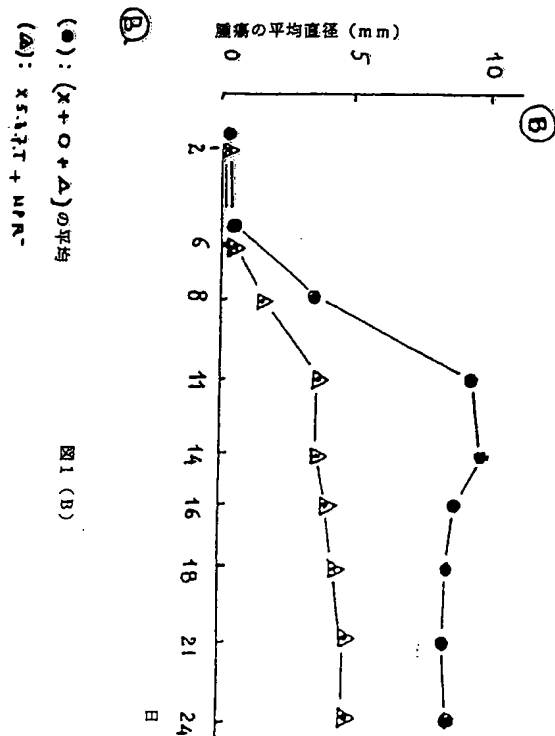
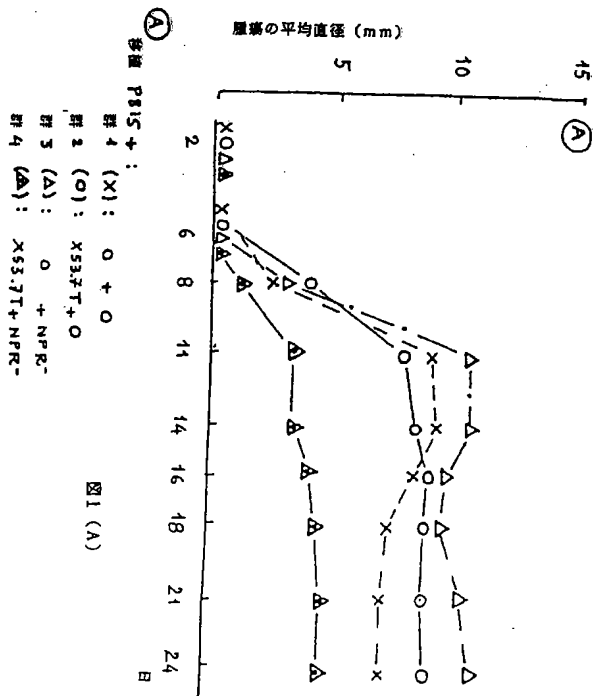
制限抗体の調査で使用した上記以外の方法1) <sup>51</sup>Cr で標識した標的を使用する補体依存細胞毒性

細胞伸介細胞溶解即ち C M C の研究で Cerottini 他により使用された方法を参考とする方法を適用した (Cerottini 他, 1974, J. Exp. Med., 140: 703)。要約すると、標的細胞 (所定のハプロタイプの M H C 細胞+ペプチド) をクロム酸ナトリウム (Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>) としての放射性クロム 51 により標識した。標的細胞 (又はペプチドなしの対照細胞) を特異的モノクローナル抗体の存在下でインキュベートした。上清中に遊離した放射性クロムを測定することにより特異的溶解百分率を推定した。制限モノクローナル抗体 X 5.3 を用いる試験の場合、二次抗体、この場合ウサギ抗マウス Ig G の抗体を加えることにより、方法を变形した。次にウサギ補体を加えた。抗体 X 5.3 を認識した二次抗体は補体を活性化させて溶解させた。例えば本方法の場合、制限抗体 X 5.3、サブクローン X 5.

陰性ではないように思われた)。

3) 遺伝子工学により得られ且つそのペプチド内容物を除去した可溶性分子 H-2 の使用

遺伝子工学により得られた (トランスメンブラン部分を欠失する) 可溶性分子 H-2 を作成し、その内在ペプチドを除去した。該分子を使用して、インフルエンザウイルスの核タンパク質のペプチドを内側に入れた。この分子は、例えばヨード 125 で標識したアロテイン A を使用する E L I S A 又はラジオイムノアッセイ (R I A) における制限抗体の標的として使用した。



**盟約書**

病原物質の抗原の特徴を有するペプチド又は細胞障害の特徴を有するペプチドと、このペプチドを認識及び固定する能力を有する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子とにより形成される複合体を特異的に認識する能力を有することを特徴とする (該ペプチドに非特異的なハプロタイプの MHC 分子と会合した該ペプチドを認識しないという意味での) 制限モノクローナル抗体。これらの抗体は病原生物による感染の診断、又は例えば癌もしくは自己免疫疾患に見られる細胞障害の診断に使用可能である。

## 國際調查報告

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) or to both national Classifications and IPC		
Int. Cl. <sup>5</sup> C 12 P 21/08, G 01 N 33/577, A 61 K 39/395, A 61 K 45/05		
A. FIELDS SEARCHED		
Classification System	Minimum Documentation Searched *	
	Classification Systems	
Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 P, C 07 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*		
Category *	Citation of Document, ** with Indication, where appropriate, of the relevant passages **	Reference to Claim No. **
A	EP. A. 0226069 (BEHRINGERKE AG) 24 June 1987  -----  	
<p>* Several categories of cited documents: "</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not expected to be of particular relevance;</p> <p>"B" prior document but published on or after the international filing date;</p> <p>"L" document which may become available as publicly available or which is placed in category B on the basis of publication status of other relevant reason; or unpublished;</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means;</p> <p>** The date of filing refers to the international filing date but may also be the priority date claimed.</p> <p>** Two documents mentioned after the international filing date refer to documents that do not conflict with the evaluation but are otherwise relevant to the principle or theory underlying the invention.</p> <p>** Document by inventor or applicant the claimed invention was derived from, prior or direct or indirect in combination with another document.</p> <p>** Document of particular relevance; the claimed invention was derived from it, even if no intermediate step exists between the document and the invention being claimed in a person skilled in the art.</p> <p>** document essential to the understanding of the invention.</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Author's Completion of the International Search	Date of Filing of This International Search Report	
25 April 1991 (25.04.91)	11 June 1991 (11.06.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

FR 9100121  
SA 45463

This entry lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The numbers are as contained in the European Patent Office EDP file as of 07/05/91.  
The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0226069	24-06-87	DE-A- 3542024	04-05-87
		DE-A- 3545576	02-07-87
		AU-A- 6578286	04-06-87
		JP-A- 62228281	07-10-87

For more details about this entry : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>

A 61 K 39/395

49/00

49/02

C 12 N 5/20

G 01 N 33/577

// C 12 N 15/06

G 01 N 33/569

(C 12 P 21/08

C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

S

8413-4C

Z

8413-4C

A B A

N

8413-4C

A

8415-4C

A

8415-4C

B

9015-2J

H

9015-2J

G

9015-2J

⑥発明者 リュケ, ビエール

フランス国、92200・ヌイリー・シユール・セーヌ、リュ・アンセル、16

⑥発明者 クリルスキー, フィリッポ

フランス国、75001・パリ、リュ・ドウ・モンパンシエ・26